

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 03-228681

(43)Date of publication of application : 09.10.1991

(51)Int.Cl.

C12N 15/51
C07K 7/10
C12P 21/02
C12Q 1/68
G01N 33/576
// C07K 99:00

(21)Application number : 02-022549

(71)Applicant : CHEMO SERO THERAPEUT RES INST

(22)Date of filing : 31.01.1990

(72)Inventor : HAYASHI NAKANOBU
SHIKATA TOSHIO
NISHIHARA TSUKASA
NOZAKI CHIKAHIDE
ARAKI MASAYASU
HOSHIKO KAZUYA

(54) NUCLEIC ACID FRAGMENT CODING NON-A NON-B TYPE HEPATITIS VIRUS ANTIGEN PEPTIDE AND METHOD FOR UTILIZING SAME FRAGMENT

(57)Abstract:

PURPOSE: To enable detection of non-A non-B type hepatitis virus in liver structure by cloning a causative virus (gene) of non-A non-B type hepatitis virus.

CONSTITUTION: A plasma obtained by adding a precipitating agent such as polyethylene glycol to a human plasma and ultracentrifuging the plasma and concentrated to about 1000 times is treated with guanidium thioacetate and extracted with phenol/chloroform and precipitated with ethanol to purify total nucleic acid in concentrated plasma. Then cDNA synthesized from DNA obtained by decomposing and purifying human-derived DNA containing deoxyribonuclease is inserted into λ gt11 vector to prepare cDNA library. Then replica obtained by culturing Escherichia coli infected by λ phage and then culturing the phage infected Escherichia coli using a nitrocellulose filter is reacted with a human or chimpanzee serum at recovery stage or acute stage of non-A non-B type hepatitis and then reacted with enzyme labeled antihuman IgG or IgM and reacted with a substrate solution to color plague and a phage corresponding to the colored plague is selected and subjected to secondary screening to provide the nucleic acid fragment coding non-A non-B type hepatitis virus antigen peptide.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑫ 公開特許公報(A) 平3-228681

⑤ Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成3年(1991)10月9日

C 12 N 15/51
C 07 K 7/10

ZNA

8318-4H
8717-4B

C 12 N 15/00

A※

審査請求 未請求 請求項の数 10 (全12頁)

⑭ 発明の名称 非A非B型肝炎ウイルス抗原ペプチドをコードする核酸断片および
その利用法

⑯ 特 願 平2-22549

⑰ 出 願 平2(1990)1月31日

⑱ 発 明 者 林 仲 信 東京都板橋区大谷口北町90-3 サンコーボ積田302
 ⑱ 発 明 者 志 方 俊 夫 千葉県市川市本北方1-17-2
 ⑱ 発 明 者 西 原 司 熊本県熊本市花園1丁目20-6
 ⑱ 発 明 者 野 崎 周 英 熊本県熊本市武蔵ヶ丘1-444
 ⑱ 発 明 者 荒 木 正 健 熊本県熊本市新大江3丁目6-42
 ⑲ 出 願 人 財団法人化学及血清療法研究所 熊本県熊本市清水町大窪668番地
 ⑳ 代 理 人 弁理士 筒 井 知
 最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

非A非B型肝炎ウイルス抗原ペプチドをコード
する核酸断片およびその利用法。

2. 特許請求の範囲

(1) 非A非B型肝炎ウイルス抗原ペプチドをコード
する核酸断片。

(2) 前記非A非B型肝炎ウイルスペプチドが、下
記の(A)から(C)のアミノ酸配列からなる群から選
ばれるアミノ酸配列もしくはその一部を含むペプ
チドである前記第(1)項記載の核酸配列。

(A) jnh1-1: Asp Glu Met Glu Glu Cys
Ala Ser His Leu Pro Tyr Ile Glu Gln
Gly Met Gln Leu Ala Glu Gln Phe Lys
Gln Lys

(B) jnh1-6: Asp Glu Met Glu Glu Cys
Ala Ser His Leu Pro Tyr Ile Glu Gln
Gly Met Gln Leu Ala Glu Gln Ser Asn
Lys Lys

(C) jnh1-16: Asp Glu Met Glu Glu Cys

Ala Thr His Leu Pro Tyr Ile Glu Gln
Gly Met Gln Leu Ala Glu Gln Phe Lys
Gln Lys

(3) 下記の(A)~(G)の核酸配列からなる群から選
ばれる核酸配列もしくはその一部を含む前記第(2)
項記載の核酸配列。

(A) jnh1-1: gatgaatggaggagtgcgcatca
caccttccttatatcgaaacagggaatgcagcttgccgaacaatt
caagcaaaaagc

(B) jnh1-2: gatgaatggaggagtgcgcatca
caccttccttatatcgaaacagggaatgcagcttgccgaacaatt
taagcaaaaagc

(C) jnh1-4: gacgagatggaggagtgcgcatca
caccttccttatatcgaaacagggaatgcagcttgccgaacaatt
caaacaaaaagc

(D) jnh1-5: gacgagatggaggagtgcgcatca
caccttccttatatcgaaacagggaatgcagcttgccgaacaatt
caagcaaaaagc

(E) jnh1-6: gatgagatggaggagtgcgcatca
caccttccttatatcgaaacagggaatgcagcttgccgaacaatt

aaacaaaaagc

(F) jnh1-8: gacgagatggaggagtgcgcata
caccttccttatatcgaaacagggaatgcagcttgcgagcaatt
taaacagaaaagc

(G) jnh1-16: gacgagatggaggagtgcgcaaca
caccttccttatatcgaaacagggaatgcagcttgcgagcagtt
caaacagaaaagc

(4) 下記の(A)から(C)のアミノ酸配列からなる群から選ばれるアミノ酸配列もしくはその一部を含む非A非B型肝炎ウイルス抗原ペプチド。

(A) jnh1-1: Asp Glu Met Glu Glu Cys
Ala Ser His Leu Pro Tyr Ile Glu Gln
Gly Met Gln Leu Ala Glu Gln Phe Lys
Gln Lys

(B) jnh1-6: Asp Glu Met Glu Glu Cys
Ala Ser His Leu Pro Tyr Ile Glu Gln
Gly Met Gln Leu Ala Glu Gln Ser Asn
Lys Lys

(C) jnh1-16: Asp Glu Met Glu Glu Cys
Ala Thr His Leu Pro Tyr Ile Glu Gln

(C) jnh1-4: gacgagatggaggagtgcgcata
caccttccttatatcgaaacagggaatgcagcttgcggaacaatt
caaacaaaaagc

(D) jnh1-5: gacgagatggaggagtgcgcata
caccttccttatatcgaaacagggaatgcagcttgcggaacaatt
caagcaaaaaagc

(E) jnh1-6: gatgagatggaggagtgcgcata
caccttccttatatcgaaacagggaatgcagcttgcgagca-at
caaacaaaaagc

(F) jnh1-8: gacgagatggaggagtgcgcata
caccttccttatatcgaaacagggaatgcagcttgcgagcaatt
taaacagaaaagc

(G) jnh1-16: gacgagatggaggagtgcgcaaca
caccttccttatatcgaaacagggaatgcagcttgcgagcagtt
caaacagaaaagc

(8) 上記第(7)項の核酸プローブを用いて、対象となるサンプルのDNAとハイブリダイゼーションさせることを特徴とする非A非B型肝炎ウイルスの検出方法。

(9) 上記第(4)項記載のペプチドを抗原として調製

Gly Met Gln Leu Ala Glu Gln Phe Lys
Gln Lys

(5) 該ペプチドが、化学的に合成されたペプチドである前記第(4)項記載の非A非B型肝炎ウイルス抗原ペプチド。

(6) 該ペプチドが、前記第(1)項の核酸断片を適当な発現ベクターに組み込み、これを宿主細胞内で発現させることにより得られるペプチドである前記第(4)項記載の非A非B型肝炎ウイルス抗原ペプチド。

(7) 下記の(A)から(G)のいずれかの塩基配列に含まれる少なくとも10塩基以上の核酸断片からなることを特徴とする非A非B型肝炎ウイルス遺伝子検出用核酸プローブ。

(A) jnh1-1: gatgaaatggaggagtgcgcata
caccttccttatatcgaaacagggaatgcagcttgcggaacaatt
caagcaaaaaagc

(B) jnh1-2: gatgaaatggaggagtgcgcata
caccttccttatatcgaaacagggaatgcagcttgcggaacagtt
taagcaaaaaagc

される抗非A非B型肝炎ウイルス抗体。

(10) 上記第(9)項記載の抗体を用いることを特徴とする非A非B型肝炎ウイルスの免疫学的検出方法。

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は、A型でもB型でもない血清型肝炎の原因ウイルス（非A非B型肝炎ウイルス）のウイルス抗原をコードする遺伝子断片、非A非B型肝炎ウイルス抗原ペプチド、およびこれら利用法に関する。

発明の背景および従来技術

ウイルス性肝炎にはA型肝炎（伝染性肝炎）とB型肝炎（血清肝炎）の2種類があることは古くから知られていた。これは主として感染経路の相違に基づいたもので、A型肝炎は経口感染で流行を起こし、B型肝炎は主として血液を介して伝播されるものであることが確認されていた。これら二つの肝炎の起因ウイルスは既に分離同定され、A型肝炎ウイルスは、ピコルナウイルスに属する、

直径27nmのRNAウイルスであり [Piaeston, S. M. et al., Science 182 p1026 (1973)]、一方B型肝炎ウイルスは、ヘパドナウイルスに属する直径42nmのエンベロープを持つDNAウイルスであることが突き止められた。[Dane, O. S., et al., Lancet, 1 p695 (1970)] また、現在では、これらの肝炎ウイルスの免疫血清学的診断方法が確立されるに至っている。

これら2つの肝炎ウイルスの確定診断方法が確立されるに従い、このいずれにも属さない非A非B型肝炎の存在が明らかになってきた [Prince, A. M., et al., Lancet, 1 p241 (1974)]。

輸血後肝炎は、B型肝炎ウイルス表面抗原 (HBs Ag) のスクリーニング方法の導入により大幅に減少したがゼロにはならず、しかも、発生した肝炎患者からは、A型、B型肝炎の感染の証拠は得られなかった。このことから、この肝炎は一般に非A非B型肝炎と呼ばれている。

この肝炎は、我国では散发性肝炎の約50%、輸血後肝炎の90%以上にのぼり、更に慢性肝炎、肝

硬変、肝癌の50%以上が非A非B型肝炎に起因すると推定されており、大きな社会問題となっている。

これとは別に、インド、ビルマ、アフガニスタン、または、北アフリカなどで経口感染で流行する、第二のウイルス性非A非B型肝炎があることが明らかになった [Khuroo, M. S., Am. J. Med., 68 p818-824, (1980)]。これは、一般には水系、または流行性非A非B型肝炎と呼ばれている。我国では、この肝炎の流行は見られていないが、渡航者の流行地からの肝炎の輸入は若干見られるようである [福原ら、第25回日本肝臓学会総会講演要旨集151頁 (1989)]。

本発明は、上記で言う前者の、主に血液を介して感染する血清型非A非B型肝炎ウイルスに関するものであり。本明細書中では、このウイルスを非A非B型肝炎ウイルスと言う。

この非A非B型肝炎についてはウイルス本体の分離同定はされておらず、このため、この肝炎の診断方法、治療法、予防法は確立されていない。

また、この肝炎の診断は除外診断によるしかなかった。即ち、患者の血清について、診断方法が確立されているA型、B型肝炎の検査を行い、これらの肝炎であることを否定し、更に、全身感染の一部の症状として肝炎症状を示す、ヘルペス、サイトメガロ、エプスタインバーウイルス感染の可能性を否定し、薬物性や、アルコール性肝炎、自己免疫性肝炎を否定して非A非B型肝炎として診断されていた。

この肝炎の原因ウイルスが感染性を持つことは、1978年アメリカの研究グループにより、チンパンジーを用いた感染実験で証明された [Tabor, E., et al., Lancet, 1 p463 (1978)]。しかし世界中の多くの努力にもかかわらず、10年以上経た今も、原因ウイルスの実態はわかっていない。患者感染チンパンジーの血液や肝組織を材料として、寒天ゲル内沈降反応、免疫電気泳動法、ラジオイムノアッセイ、蛍光抗体法、電顕法などのA型およびB型肝炎の研究で用いられたほとんどすべてのアプローチにより、ウイルスや関連抗原抗体系検し

が行われたきたが、いまだ確実といわれるものは得られていない。

非A非B型肝炎ウイルス究明の歴史は、期待と失望の歴史であったともいえる。数多くのウイルスあるいは抗原抗体系の候補が浮かび上がってきたが、それらは次々に否定されていった [Prince, A. M., Ann. Rev. Microbiol., 37, p217, (1983)]。

最近の例では、Setoらのレトロウイルス説があり [Seto, B. et al., Lancet, 1 p941-943 (1984)]、彼等によると、チンパンジーに非A非B型肝炎を起こすことが証明されている血清や血液製剤に逆転写酵素活性が検出され、ショ糖密度勾配遠心ではこの酵素は、1.14g/mlの部分にくる、すなわちレトロウイルスと似た浮上密度を持つというものであった。続いて、Princeらは、チンパンジー肝初代培養細胞に患者血清を接種して、レトロウイルス様粒子が見られたと報告した [Prince, A. M. et al. Lancet, 1: p1071-1075 (1984)]。しかしながら、逆転写酵素活性はHollingerらの追試により否定された [Hollinger et al., Lancet,

1 p41 (1986)]. 更に、Princeらの観察したウイルス粒子はミクソウイルスの混入として否定された。

非A非B型肝炎の研究を困難にしている問題点は、血清中のウイルス濃度が $10^2 \sim 10^3$ と低いこと、同じ接種材料で再感染を起こしたチンパンジーがあるなど、抗体の存在が疑がわしいこと、感染実験モデルがチンパンジー、マーマセツしかないことなどである。

最近になって米国のカイロン社が、非A非B型肝炎ウイルスのcDNAを捕らえたという報告があったが[Choo, Q. et al., Science, 244, P359-362 (1989), Huo, G. et al., Science, 244, p362-364 (1989)], ウイルスそのものの性状、ウイルス構成蛋白の性状などはまだ明らかにされていない。

一般に、ウイルスの違いは、その免疫血清学的性状の違い、分子遺伝学的性状の違いより診断方法がまったく異なってくる。また、株の違いは、免疫血清学的性状が一部異なるため同一の診断方法では株間の違いにより検出感度の違い、ワクチ

ンでは免疫原性、感染防御能の違いが出てくる。分子遺伝学的診断方法、たとえばDNAプローブ診断においては、プローブとウイルス核酸の間のハイブリダイゼーションは核酸レベルでのホモロジーが非常に高くないと実用的ではないことが一般に知られている。すなわち、株間での核酸レベルでの差異により、DNAのハイブリダイゼーションが起こらず、DNAプローブ診断が効果的にできないケースが考えられる。

血清型の肝炎として、よく知られ、既によく解析されているB型肝炎においては、欧米、東南アジア等の地域ごとにメジャーなB型肝炎ウイルスのサブタイプ、すなわちその地域に特徴的な流行株(サブタイプ)が存在することが知られていることから、本発明の対象となる非A非B型肝炎ウイルスにおいても地域に特有なウイルス種、もしくはウイルス株等が存在することが考えられる。

したがって、特定の地域、例えば特に日本で流行している非A非B型肝炎ウイルスの診断方法、予防方法を確立するには、日本でメジャーな非A

非B型肝炎ウイルス株を捕らえる必要がある。

発明の目的

このような状況のもとに、本発明者らは、非A非B型肝炎の原因ウイルスもしくはそのウイルス遺伝子のクローニングを目的として研究を重ねた結果、肝炎患者血清より非A非B型肝炎ウイルスの抗原ペプチド配列をコードしている遺伝子をクローニングすることに成功した。

すなわち、本発明者らは、献血者のGPT高値血漿を用いて、従来の免疫血清学的方法とは違った新しい分子遺伝学的手法を取り入れたイムノスクリーニング法により、非A非B型肝炎ウイルスに特有なペプチドをコードしている遺伝子をクローニングした。さらに、この遺伝子断片を遺伝子組換え技術を用いて発現させ得られた発現産物が、非A非B型肝炎患者血清と蛋白レベルにおいても特異的に反応することを確認し、本発明を完成するに至った。

発明の構成および効果

本発明の目的とするような核酸断片をクローニ

ングするに際しては、研究材料として非A非B型肝炎に感染した日本人の肝臓、並びに非A非B型肝炎を感染させたチンパンジーの肝臓を用い、mRNAを抽出しcDNAを合成して、その中から、染色体DNAとのサブトラクションによりウイルス特異的cDNAを選択してくることが考えられる。しかしながら、これに必要な良い実験材料を十分な量確保することはきわめて困難である。

もう一つの研究材料として非A非B型肝炎感染者あるいは感染チンパンジーの血漿が考えられる。ヒトでは非A非B型肝炎のキャリアーの存在が確認されており、輸血において供血者のGPT値が高い程輸血後非A非B型肝炎の発生頻度が高いことからGPT高値の血漿はキャリアーの頻度が高いと推定されている。そこで我々は比較的多量に入手可能である、日本の献血者のGPT高値血漿をアールし、研究材料とした。このほか、日本人の非A非B型肝炎患者の血清を接種し非A非B型肝炎を発症させたチンパンジーの血漿も用いることができるが、現在ではチンパンジーの入手

性から多少問題が残る。

血漿中の非A非B型肝炎ウイルス濃度は先に述べたように $10^2 \sim 10^3$ 程度しかないと推定されていることから、ウイルス核酸の抽出およびcDNAの合成には1000倍程度ウイルスを濃縮する必要がある。しかしながら、ヒト血漿は7%前後の蛋白溶液であり、ただ単に濃縮することは不可能であり、除蛋白をしながらウイルスを濃縮する必要がある。我々が用いたポリエチレングリコール(PEG)などの沈澱剤による沈澱形成は、比較的簡便に行うことができ、大量の血漿の処理にも適しており、ウイルスの失活も少ないマイルドな方法である。このほかには、超遠心によるベレティング、硫酸などの塩類の添加による塩析、限外濾過、ゲルクロマトグラフィーなどが用いられる。

このように1000倍程度に濃縮した血漿をグアニジウムチオシアネートで処理し、フェノール/クロロホルムで抽出をおこない、エタノール沈澱により濃縮血漿中の全核酸を精製する。次にDNA分解酵素で混入しているヒト由来のDNAを分解

し、フェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈澱によりRNAを精製する。

精製したRNAよりcDNAを合成し、 λ gt11ベクターに挿入しcDNAライブラリーを作成する。

λ ファージを大腸菌に感染させ、細菌培養プレートにまき、42℃で数時間培養する。その後ニトロセルロースフィルター(NCフィルター)をかぶせ数時間培養し、NCフィルターをはがしレプリカをとる。

このレプリカをブロッキング液で処理し、PBSなどで洗浄した後イムノスクリーニングを行う。すなわち、レプリカを非A非B型肝炎回復期あるいは急性期のヒトまたはチンパンジー血清と反応させ、PBSなどで洗浄後、酵素標識抗ヒトIgGまたはIgMと反応させ、洗浄後、基質溶液と反応させて発色させる。発色したブランクに対応するファージを選び二次スクリーニングを行い、再現性のあるクローンを得た。

このクローンについて非A非B型肝炎特異性を

調べた。

非A非B型肝炎回復期、キャリア期、および正常期のチンパンジーのIgGを用いてブランクイムノアッセイを行った結果非A非B型肝炎キャリア期に特異性の高いクローンを得ることができた。このクローンをサブクローニングし、アクリルアミドゲル電気泳動で約90bpの挿入断片(Jnh1-1)を確認した。

チンパンジーの正常及び非A非B型肝炎急性期の肝臓、並びに正常人の白血球より染色体DNAを精製し、アガロース電気泳動を行った後、 32 P標識したJnh1-1クローンをを用いてサザンハイブリダイゼーションを行った。Jnh1-1はいずれのDNAとも反応せず、したがってJnh1-1は染色体由来DNAでないと判明した。

また、日本人のGOT、GPT高値血漿のプール(非A非B型肝炎感染性がチンパンジー感染実験で確認されている)、アメリカNIH由来F株の非A非B型肝炎を感染したチンパンジー血漿および日本の正常人血漿からRNAを抽出し、cD

NAを合成し、Jnh1-1クローンの塩基配列の一部をプライマーとしてPCR反応[Saiki et al., Science 239, p487- (1988)]を行った。同様に正常ヒト肝臓よりDNAを抽出し同じプライマーを用いてPCR反応を行った。その結果、日本人のGOT、GPT高値血漿のプールのみからJnh1-1塩基配列が検出された。このことは、我々が捕らえたJnh1-1の塩基配列を含む非A非B型肝炎ウイルスは、米国NIH由来F株の非A非B型肝炎ウイルスと核酸配列上かなり相違があることを示唆している。

本発明のJnh1-1クローンのDNA配列は、ジデオキシ法により決定された。その結果Jnh1-1クローンは非A非B型肝炎ウイルス遺伝子由来の計80bpのcDNA断片であり、その塩基配列は第3図の中に示される通りであった。この塩基配列とこれから推定されるアミノ酸配列をデータベース(Genetyx-CD ソフトウェア開発 1989)で検索したところ、現在まで知られているウイルス、細菌、その他ホモロジーを示すものはなかった。

このアミノ酸配列から、BOPP & WOOD らの手法に基づき、Jah1-1がコードするペプチドの親水性・疎水性のパターンを解析した。その結果、第5図に示すような結果が得られ、このペプチド領域は、全体的に親水性の強いペプチドであることが確認された。

このように、本発明で得られたcDNA断片が、非A非B型肝炎ウイルス抗原のうち親水性の強いペプチド領域をコードするものであったことは、免疫学的見地からも非常に意義深いものと思われた。また、このような親水性のペプチドは取扱いが容易になることから、実用性の面からも非常に有用である。

非A非B型肝炎との関連性をさらに確認するために、多数の肝炎患者、正常人の血清を用いてJah1-1に対するアークイムノアッセイ及びドットイムノアッセイを行った。その結果、正常人、B型肝炎、その他の肝炎の群に比べ非A非B型肝炎患者で高率に抗体陽性者が検出され、イムノアッセイにより蛋白レベルでも非A非B型肝炎に対す

る特異性が証明された。

非A非B型肝炎には複数の因子が関与しているとも考えられているので次にJah1-1の塩基配列の一部を参考にプライマーを合成してGOT・GPT高値ヒトブール血漿についてPCR反応を行いサブタイプのクローニングを実施した。PCR反応後の産物をλgt11ベクターに挿入し、in vitroパッケージングを行い感染性ファージ液を調製後、抗体によるスクリーニング、あるいはJah1-1内のオリゴプローブを用いたハイブリダイゼーションを行った。その結果、抗体と反応するファージを2クローン(Jah1-8, Jah1-16)、オリゴプローブと反応するファージを4クローン(Jah1-2, Jah1-4, Jah1-5, Jah1-6)を得た。これら6クローンについても同様にジデオキシ法により塩基配列を決定し(第3図参照)、推定されるアミノ酸配列を比較した(第4図参照)。

本発明の遺伝子配列は、これを適当な発現系を用いて発現させ、非A非B型肝炎ウイルスの抗体検査に使用することができるし、また、発現した

蛋白を動物に免疫して抗体を作らせ、これを用いて非A非B型肝炎感染患者の肝組織中の非A非B型肝炎ウイルスを検出することも可能である。

さらに、本発明で得られた非A非B型肝炎ウイルスは、感染予防のためのワクチンの作製に極めて有用である。

また、遺伝子配列そのものは、非A非B型肝炎のDNAプローブ診断キットの開発に極めて有用である。

このような、本発明の非A非B型肝炎ウイルス抗原ペプチドをコードする核酸断片、非A非B型肝炎ウイルス抗原ペプチドおよびこれらを利用した非A非B型肝炎ウイルスの各種検出方法は、特に日本における非A非B型肝炎ウイルスの検出において極めて有用であると考えられる。

以下、実施例に沿って本発明を更に詳細に説明する。

実施例

(1) GOT、GPT高値ヒトブール血漿の濃縮

日本赤十字社より供与された、HBs抗原陰性でG

PT値100以上のヒトブール血漿(8.5g)を以下の方法で1000倍に濃縮した。まず、ヒトブール血漿を粗遠心し、不溶物を除去した。これに1/10量の5M塩化ナトリウム液、次いで1/10量の40%(W/W)ポリエチレングリコール液(PEG6000、和光純薬社製、平均分子量7500)を4℃にて攪拌しながら添加した。一時間静置したのち、7000回転、20分間遠心分離して上清を除き、沈渣に元の血漿の約1/20量のTNE液(10mM Tris-HCl, pH7.4, 1mM EDTA, 140mM NaCl)を加え、再溶解した。この溶液を、蔗糖の20%、15%、10%および5%TNE液を段階的に重層した遠心管の頂部に重層し、4℃、80000×Gで、12時間超遠心分離した。分離後、上清を除去し、沈渣を8mlのPBSに溶解してGOT、GPT高値ヒトブール血漿の1000倍濃縮物とした。

(2) GOT、GPT高値ヒトブール血漿濃縮物からのRNAの精製

まず、前記の1000倍濃縮血漿8mlに5倍量のグアニジウムチオシアネート溶液(4Mグアニジウムチオシアネート、50mM Tris-HCl pH7.6、10mM EDTA、

0.1M 2-メルカプトエタノール、2%ザルコシル)を加え、攪拌した後フェノール/クロロホルム抽出し、グリコーゲンをキャリアーとしてエタノール沈澱により濃縮血漿中の全核酸を精製した。次に、この全核酸中に存在するヒト由来のDNAを分解するために、2mMバナジリボヌクレオチッドコンプレックス存在下、RNaseフリーDNase 1.15KU/ml (ベーリンガー/マンハイム社製)、50mM Tris-HCl pH7.4、1mM EDTA、10mM MgCl₂の混液400μl中にて、37℃、30分間処理した。その後、250mM EDTA液16μl、10% SDS液8μlを加え反応を停止し、フェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈澱によりRNAを精製した。さらに、このRNA中に存在する多量のグリコーゲン及び微量に存在すると思われる不純物を除くために、QIAGEN pack-100 (DIA GEN社製)を用いて精製操作を行った。

(3) cDNAライブラリーの構築

前記までの方法で精製したRNAすべてを、cDNA合成システムプラス (アマシャム社製)を用いてcDNA合成を行った。次に、合成したcDNAをcDNAクロ

10分間、4℃で遠心分離し、上清を除去して沈澱を得た。この沈澱1g当り4mlのRIPA液(1%デオキシコール酸ナトリウム、1% Triton X-100、0.3M NaCl、0.1% SDS、0.1M Tris-HCl pH7.5、1mM PMSF)を加えて可溶化し、これをさらに9000回転、10分間、4℃で遠心分離してその上清を大腸菌ライゼートとした。

(B) 抗体スクリーニング用レプリカフィルターの作製

GOT、GPT高値ヒトアール血漿濃縮物中のRNAより構築したcDNAライブラリーから、一枚のLBプレート[1.5% Agar (日水製薬社製)、1% Bacto-tryptone、0.5% Bacto-yeast extract、1% NaCl pH7.5、50μg/mlアンピシリンの入った細菌培養用プレート(マンク社製: 23cm×23cm)]当り10000PFUのファージをとり、大腸菌Y1090に37℃で15分間感染させて、Top Agar 40ml (0.7% Agar、1% Bacto-tryptone、0.5% Bacto-yeast extract、1% NaCl、pH7.5、50μg/mlアンピシリン)と共にまき、42℃で4~5時間培養した。その後、10mM IPTG (シグマ

ーニングλgt11 (アマシャム社製)によりλgt11ベクターにクローニングした。in vitroパッケージングの結果、 1.8×10^8 プラークフォーミングユニット(PFU)のライブラリーを得た。

(4) 非A非B型肝炎(NANBH)回復期及びキャリアー期のチンパンジー血漿によるNANBHウイルス関連クローンのスクリーニング

(A) 大腸菌ライゼートの調製

cDNAライブラリーのスクリーニングに用いる一次抗体はNANBH回復期及びキャリアー期のチンパンジー血漿であることから、高い非特異反応が予想された。そこで、この非特異反応を抑えるためにスクリーニング用チンパンジー血漿の吸収操作に用いる大腸菌Y1090のライゼートを調製した。即ち、単一コロニーからアンピシリン50μg/mlを含むLB増地[1% Bacto-trytone (ジフコ社製)、0.5% Bacto-yeast extract (ジフコ社製)、1% NaCl、pH7.5]中で37℃、一夜培養した大腸菌Y1090培養液20mlを2gのLB増地に加え、さらに37℃で一夜培養した。この培養液を遠心管に移し、9000回転、

社製)を染みこませたニトロセルロースフィルター(NCフィルター: S & S社製、Code BA85、23cm×23cm)をかぶせ、さらに37℃で培養を続けた。3時間後NCフィルターをプレートからはがし、PBSで洗い、Blocking液(5% スキムミルク、0.05% NaN₃を含むPBS溶液)に浸し、4℃で一夜振とうした。

(C) 抗体スクリーニング

ブロッキング液中で一夜浸したレプリカフィルターをPBSで洗浄後、PBSで10倍に希釈したNANBH回復期及びキャリアー期のチンパンジーアール血漿(スクリーニング用血漿)[NANBH回復期及びキャリアー期のチンパンジーアール血漿をPBSで5倍希釈し、1/20量の大腸菌ライゼートを加えて4℃で一夜非特異反応の吸収操作を行い、さらにPBSで2倍希釈した。]に浸し、室温で振とうしながら反応させた。2時間後、PBS-T(0.05% Tween20を含むPBS溶液)で、一回につき15分間、計3回レプリカフィルターを洗浄の後、各々1000倍希釈したベルオキシダーゼ標識抗ヒトIgGとIgMヤギ抗体(NBL社

製、Fab)の入ったインキュベーションバッファー(1%牛血清アルブミンを含むPBS溶液)に浸し、37℃で揺とうしながら反応させた。1時間後、PBS-Tで一回につき15分間、計4回、その後PBSで5分間洗浄後、発色液[0.02% DAB(シグマ社製)、0.1% $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.005% H_2O_2]に浸し発色させた。NCフィルター上で発色したブランクに対応するファージを選び、二次スクリーニングを行った。即ち、一次スクリーニングで選択した各ファージ200PFUを別々に挿入断片のないファージ200PFUと共に大腸菌Y1090に感染させ、90mmシャーレ(ペクトンディッキンソン社製)のLBプレートにまき直し、レプリカフィルターを作製した。これらを上述の方法で抗体スクリーニングし、NANBH回復期及びキャリア期のチンパンジー血漿と再現性よく反応するファージを1クローン(Jnh1)得た。

(5)チンパンジー血清中の抗体を用いた各クローンのNANBHに対する特異性の検討

(4)で得たクローンについて、(4).Cの2次スクリーニングと同様にレプリカフィルターを作製し、

NANBH回復期、キャリア期及び正常のチンパンジー血清又は、破安沈過後DEAE-セルロフィンカラム(生化学工業社製)で精製したIgG分画を用いてブランクアッセイを行った。その方法は抗体スクリーニングの場合と同様であるが、一次抗体反応にチンパンジーのIgG分画を用いる場合には50 μl /mlの濃度にPBSで希釈し、1/20量の大腸菌ライゼットを加え、4℃で一夜非特異反応の吸収処理をして使用した。

ブランクアッセイの結果、Jnh1はNANBHキャリア期のチンパンジー血清あるいはIgG分画と高率に反応し、正常チンパンジーの血清あるいはIgG分画とは全く反応しなかった。

この結果から、Jnh1は特にNANBHキャリア期のチンパンジー血清に特異性の高いクローンであるといえる。

このJnh1のファージDNAを精製[実験医学臨時増刊号、遺伝子工学総集編 5(11)、P31-32(1987)参照]し、制限酵素EcoRI(東洋紡社製)切断後pUC118ベクターのEcoRI部位に挿入し、サブクロー

ニングを行った[Douglas Hanahan, J. Mol. Biol. 166, P557-580(1983)参照]。このサブクローニングしたプラスミドpJnh1-1をEcoRI切断後、電気泳動で5%アクリルアミドゲルに展開したところ、約90bpの挿入断片(Jnh1-1)が確認できた(第1図)。

(6)Jnh1-1を用いたサザンブロット分析

下記のとおり、Jnh1-1を用いたサザンブロット分析を行った。チンパンジーの正常及び米国NIH由来F株感染NANBH急性期(NANBHウイルス接種後8週目)の肝臓、さらに正常人の白血球より染色体DNAを精製し、各々20 μg をEcoRIで切断後、電気泳動で2%アガロースゲルに展開し、NCフィルターに転写した。このフィルターをマルチプライム法で[^{32}P]標識したJnh1-1プローブを用いサザンハイブリダイゼーションを行った(第2図)。この図からわかるように、Jnh1-1プローブは、一週間オートラジオグラフィすると、サブクローニング前のJnh1クローンとは反応するが、正常及びNANBH急性期のチンパンジーの染色体DNAあるいは正常なヒ

トの染色体DNAとは反応しなかった。このことから、Jnh1-1はヒトの染色体DNA由来のクローンではなく、ウイルス等の外来性の核酸由来のものであると考えられる。

(7)Jnh1-1の核酸塩基配列とアミノ酸配列

(A) Jnh1-1クローンの塩基配列の決定

Jnh1-1の遺伝子断片を組み込んだプラスミドDNAを鋳型とし、[α - ^{32}P] dCTP(800Ci/ μmol)を反応に用いた。Klenow fragmentによるポリメラーゼ反応は宝酒造の7DEAZAシーケンシングキットによって行った。8%のポリアクリルアミド-8Mウレアゲルを用いて、4時間1800Vで電気泳動し16時間感光した。

(B) 得られた塩基配列と予測されるアミノ酸配列

上記の結果得られた塩基配列とそれから予測されるアミノ酸配列の解読の結果をそれぞれ第3図および第4図に示した。

Jnh1-1の予測されるアミノ酸配列の親水性/疎水性プロファイルを第5図に示す。

得られた塩基配列及びアミノ酸配列をデータベ

ース（前述）で検索した結果、ウイルス、細菌その他の高いホモロジーを示すものはなかった。

(8) Polymerase Chain Reaction (PCR) を利用した jnh1-1 塩基配列の検出

jnh1-1 クローンを取るための材料となった GOT、GPT 高値ヒトブール血漿、米国 NIH 由来の HANBB の F 株を接種し慢性化したチンパンジーの血漿（感染性は確認済み）、正常ヒト血漿およびヒト肝臓由来の染色体 DNA について、PCR 反応を用いて jnh1-1 塩基配列の検出を行った。まず、各血漿については、各々 1ml を (1) 項と同様に、5M 塩化ナトリウム液と 40% (w/w) ポリエチレングリコール液を用いて沈澱させ、この沈澱に 500μl のグアニジウムチオシアネート溶液を加え、フェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈澱により全核酸を精製した。これを、50mM Tris-HCl pH8.3、6mM MgCl₂、40mM KCl、1mM DTT、1mM dNTPs、1.3KU/ml RNasin、30ng/ml ランダムプライマー、4KU/ml 逆転写酵素（BR L 社製）の混液 20μl 中で、37℃、1時間30分間反応させた。この反応液 1μl をとり 10mM Tris-HCl pH8.3、

50mM KCl、1.5mM MgCl₂、0.01% (w/v) ゼラチン、100nM dNTPs、250nM プライマー（第6図にその位置を示す）20U/ml Taq polymerase の混液 50μl 中で、94℃：30秒、55℃：30秒、72℃：1分を1サイクルとして40サイクル反応させた（パーキン・エルマー・シータス社製のサーマルサイクラーを使用）。またヒト肝臓由来の染色体 DNA については、10μg を上記組成の反応液中で、上記と同一条件下で PCR 反応を行った。PCR 反応後、各サンプル共 5μl を取り、電気泳動により 2% アガロースゲルに展開し、KC フィルターに転写した。このフィルターを [³²P] 標識した jnh1-1 内のオリゴプローブ（第6図にその位置を示す）を用いてハイブリダイゼーションを行った。その結果 jnh1-1 塩基配列は、材料となった GOT、GPT 高値ヒトブール血漿からは検出されたが、正常ヒト血漿、米国 NIH 由来 F 株のチンパンジー血漿及び染色体 DNA 中には検出されなかった（第8図）

(9) jnh1-1 クローンの非 A 非 B 型肝炎に対する特異性の検討

jnh1-1 の cDNA 断片を発現プラスミド pUEX2 に

表 1

血 清	陽性/検体	陽性率 (%)
正常人	0 / 20	0.0
非 A 非 B 型肝炎患者	17 / 30	56.7
B 型肝炎患者	1 / 9	11.0
その他の肝炎患者	0 / 10	0.0

以上のように、非 A 非 B 型肝炎の患者群においては陽性率が 56.7% と非常に高率であるのに対し、正常人、B 型肝炎患者およびその他の肝炎では陽性率 0.0%、11.0%、0.0% と極めて低く、本発明の jnh1-1 クローンが非 A 非 B 型肝炎特異的である事が示された。

(10) Polymerase Chain Reaction (PCR) を利用した jnh1-1 サブタイプのクローニング

非 A 非 B 型肝炎には複数の因子が関与しているとも考えられているので jnh1-1 の塩基配列の一部を参考にプライマー（第7図参照）を合成し、こ

読み枠が一致するように挿入し、大腸菌 JM109 形質転換後ドットイムノアッセイを行った。この発現プラスミドは 30℃ から 42℃ への温度シフトにより発現に誘導がかかるので以下の方法で行った。

形質転換した大腸菌をアンピシリン (Ap) 含有 (50μg/μl) LB で 30℃ 一夜培養し、翌日クレット値が 80 となるように LB で希釈後、30℃ 1.5 時間さらに 42℃ へ移して 2 時間培養し発現を誘導した。その後集菌し菌体を 1μl PBS-T に溶解し、1g のガラスビーズを加えボルテックスミキサーで破碎し、そのペレットを 1μl の 50mM TrisHCl, pH 8.0、10 mM EDTA に懸濁してドットアッセイに用いた。この懸濁液をニトロセルロースフィルターに 5μl スポットした。乾燥後ブロッキング反応から発色反応までは (4) c と同様に行った。その結果を表 1 に示す。

(以下余白)

れを用いて jnh1-1 のクローンを取る材料となった GOT・GPT 高値ヒトアール血漿（日本人由来）について PCR 反応を行いクローニングを実施した。PCR 反応条件は (8) に記載してある方法に準じて行った。PCR 反応後の産物を cDNA クローニング λgt11（アマーシャム社製）により λgt11 ベクターにクローニングし、in vitro パッケージングを行い感染性ファージ液を調製した。次に、(4)B の方法に従ってスクリーニング用のレプリカフィルターを作製し、抗体によるスクリーニングあるいは jnh1-1 内の混合オリゴプローブ（第 7 図にその位置を示す）を用いてのハイブリダイゼーションによるスクリーニングを行った。抗体スクリーニング用血漿としてはキャリア期のチンパンジーアール血漿を用いて (4)C の二次スクリーニングの場合と同様に行った。スクリーニングの結果オリゴプローブと反応するクローンを 4 クローン（jnh1-2、jnh1-4、jnh1-5、jnh1-6）、キャリア期のチンパンジー血漿と反応するファージを 2 クローン（jnh1-8、jnh1-16）おのおの得た。こ

うの位置を示したものである。

第 7 図は、実施例 (10) における PCR 反応に使用した jnh1-1 の塩基配列を参考とした混合プライマー及び混合オリゴプローブの位置と塩基配列を示したものである。

第 8 図は、本発明でクローニングした jnh1-1 の塩基配列中のプライマーを用い、PCR 反応を利用して、ヒトの染色体 DNA 及び血清中の核酸から増幅した遺伝子のハイブリダイゼーションの模式図である。

これらの 6 クローンの塩基配列ならびにアミノ酸配列を第 3 図ならびに第 4 図に示す。

4. 図面の簡単な説明

第 1 図は、本発明においてクローニングした pJnh1-1 の EcoRI 挿入断片の 5% アクリルアミドゲル電気泳動図の模式図である。

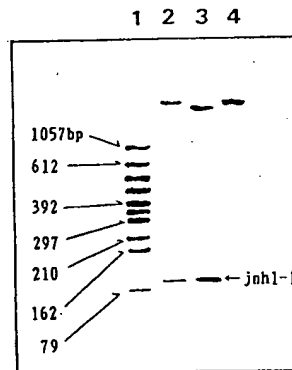
第 2 図は、本発明においてクローニングした jnh1-1 とヒト及びチンパンジーの染色体 DNA とのサザンハイブリダイゼーションの模式図である。

第 3 図は、本発明でクローニングした非 A 非 B 型肝炎ウイルス抗原をコードする核酸断片の塩基配列を示す。

第 4 図は、本発明でクローニングした非 A 非 B 型肝炎ウイルス核酸断片がコードするアミノ酸配列を示す。

第 5 図は、アミノ酸配列を基に解析した、jnh1-1 がコードするペプチドの親水性・疎水性プロファイルを示す。

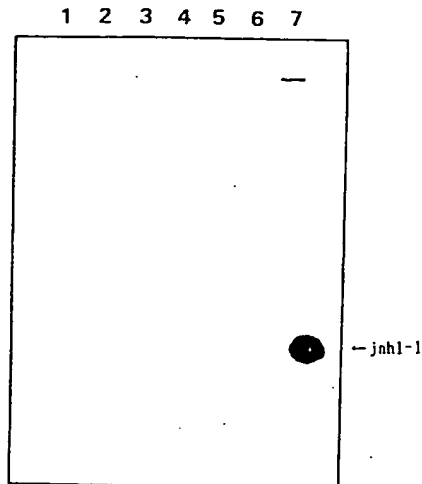
第 6 図は、実施例 (8) における PCR 反応に使用した jnh1-1 塩基配列中のプライマー及びオリゴプロ



レーン 1: ϕ X174/Hinc II マーカー
 2: jnh1 (EcoRI 処理)
 3: jnh1-1 プラスミド (EcoRI 処理)
 4: jnh1-1 プラスミド (未処理)

第 1 図

特許出願人 財団法人 化学及血清療法研究所
 代理人 弁護士 筒井 知



レーン1: 正常チンパンジー肝臓より抽出したDNA-1
 2: " DNA-2
 3: 非A非B型肝炎急性期チンパンジー肝臓より抽出したDNA
 4: 正常ヒト白血球より抽出したDNA-1
 5: " DNA-2
 6: " DNA-3
 7: jnh1

第2図

jnh1-1: gatgaaatggaggagtgcgcatca
 cacccttcttataatcgaaacagggaatgcagcttgcggaacaatt
 caagcaaaaagc

jnh1-2: gatgaaatggaggagtgcgcatca
 cacccttcttataatcgaaacagggaatgcagcttgcggaacagtt
 taagcaaaaagc

jnh1-4: gacgagatggaggagtgcgcatca
 cacccttcttataatcgaaacagggaatgcagcttgcggaacaatt
 caaacaaaaagc

jnh1-5: gacgagatggaggagtgcgcatca
 cacccttcttataatcgaaacagggaatgcagcttgcggaacaatt
 caagcaaaaagc

jnh1-6: gatgagatggaggagtgcgcatca
 cacccttcttataatcgaaacagggaatgcagcttgcggaaga-at
 caaacaaaaagc

jnh1-8: gacgagatggaggagtgcgcatca
 cacccttcttataatcgaaacagggaatgcagcttgcggaacaatt
 taacacagaagc

jnh1-16: gacgagatggaggagtgcgcaaca
 cacccttcttataatcgaaacagggaatgcagcttgcggaagcagtt
 caaacagaagc

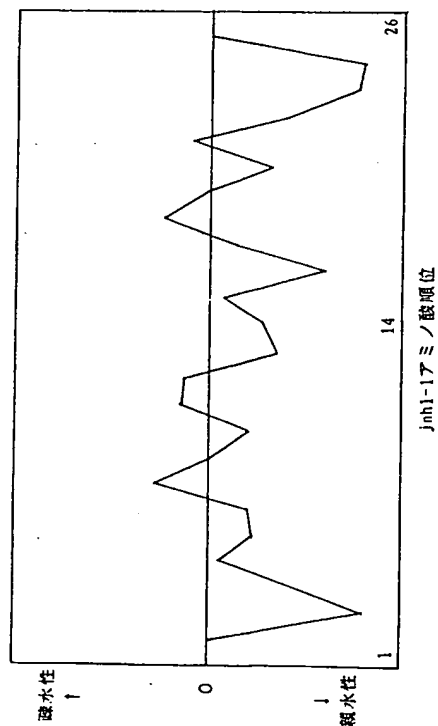
第3図

jnh1-1: Asp Glu Met Glu Glu Cys
 Ala Ser His Leu Pro Tyr Ile Glu Gln
 Gly Met Gln Leu Ala Glu Gln Phe Lys
 Gln Lys

jnh1-6: Asp Glu Met Glu Glu Cys
 Ala Ser His Leu Pro Tyr Ile Glu Gln
 Gly Met Gln Leu Ala Glu Gln Ser Asn
 Lys Lys

jnh1-16: Asp Glu Met Glu Glu Cys
 Ala Thr His Leu Pro Tyr Ile Glu Gln
 Gly Met Gln Leu Ala Glu Gln Phe Lys
 Gln Lys

第4図



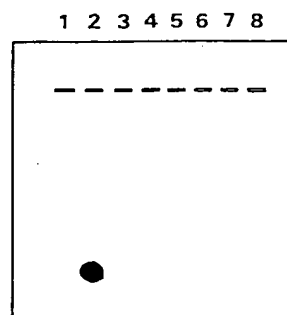
第5図

jnh1-1: gatgaatggaggagtcgcatcacaccttcc
プライマー

ttatatcgaacagggaatgcagcttgccgaacaattcaagcaaa
ATATAGCTTGTCCTTAC TTCGTTAAGTTCGTTT
オリゴアローブ プライマー

aagc
TTCG

第 6 図



jnh1-1: gatgaatggaggagtcgcatcacaccttcc
GAATTCGA^TGA^AATGGA^GGA ←プライマー
ttatatcgaacagggaatgcagcttgccgaacaattcaagcaaa
AT^ATA^ACT^TGT^TCT^TTAC CT^TGT^TAA^ATT^TET^TT
aagc オリゴアローブ プライマー
T^CCGCTTAAG

第 7 図

レーン1: 米国NIH-F株感染チンパンジー血漿より抽出したDNA
2: GOT・GPT高値ヒトブール血漿由来cDNA
3: 正常ヒト血漿由来cDNA-1
4: " cDNA-2
5: " cDNA-3
6: ヒト肝臓由来染色体DNA-1
7: " DNA-2
8: " DNA-3

第 8 図

第1頁の続き

⑤Int. Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号
C 12 P 21/02		8214-4B
C 12 Q 1/68	A	6807-4B
G 01 N 33/576	Z	9015-2G
// C 07 K 99:00		

⑫発明者 星子 和哉 熊本県菊地郡合志町豊岡2000-769

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.